

REC'D 15 NOV 2000

PCT/JP00/06471

WIPO PCT

21.09.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6471

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月21日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第266548号

出願人

Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社



10/088594

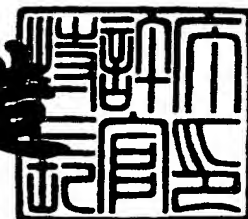
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087560

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0802T4

【提出日】 平成11年 9月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社  
                                技術研究所内

    【氏名】 池田 正人

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社  
                                技術研究所内

    【氏名】 高野 裕

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社  
                                技術研究所内

    【氏名】 中野 哲郎

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社  
                                技術研究所内

    【氏名】 鎌田 望

【特許出願人】

    【識別番号】 000001029

    【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

    【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 008187

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規トランスアルドラーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 1 記載のポリペプチドにおいて、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランスアルドラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 5】 配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 7】 請求項 4 ～ 6 いずれか一項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 8】 請求項 7 記載の組換え体 DNA を保有する微生物。

【請求項 9】 請求項 4 ～ 6 いずれか 1 項に記載の DNA、または該 DNA の上流に存在する転写・翻訳に関わる DNA の塩基配列中に 1 以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入されることによりトランスアルドラーゼの活性が増強された微生物。

【請求項 10】 微生物が、芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生産する能力を有する微生物である、請求項 8 または 9 記載の微生物。

【請求項 11】 請求項 10 記載の微生物を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

【請求項 12】 請求項 4 ～ 6 いずれか 1 項に記載の DNA、または該 DNA の上流に存在する転写・翻訳に関わる DNA の塩基配列中に 1 以上の塩基が置

換、欠失若しくは挿入されることによりトランスアルドラーゼの活性が低下または欠損した微生物。

【請求項 1 3】 微生物が、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生産する能力を有する微生物である、請求項 8 または 1 2 記載の微生物。

【請求項 1 4】 請求項 1 3 記載の微生物を培地に培養し、培養物中に L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

【請求項 1 5】 請求項 8 または 9 記載の微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することを特徴とする、該糖の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、新規に見出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する微生物、および該微生物を利用した芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸、核酸関連物質、あるいは新規な糖等の製造法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

トランスアルドラーゼはペントースリン酸経路の酵素であり、芳香族アミノ酸や芳香族ビタミン等の芳香族化合物、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、リボフラビン等の生合成や代謝に重要な役割を担っている [アーカイブス オブ マイクロバイオロジー (Arch. Microbiol.), 164, 324(1995)]。従って、それら代謝産物の効率的な発酵生産菌を育種するための標的として、トランスアルドラーゼ遺伝子およびその遺伝子産物は

有用である。

【0003】

トランスアルドラーゼを用いた糖の合成については、澱粉を処理したものから D-フルクトースを生成するために使用された例 [J. Am. Chem. Soc., 114, 6980 (1992)] が報告されている。

【0004】

トランスアルドラーゼをコードする DNA については、エシエリヒア・コリ由来の遺伝子 [ジーンバンク (GeneBank)、アクセッション・ナンバー (Accession Number) D13159]、マイコバクテリウム・ツベルクロシス由来の遺伝子 [ネイチャー (Nature), 393, 537 (1998)]、シネココッカス由来の遺伝子 [プラント・モレキュラー・バイオロジー (Plant Mol. Biol.), 30, 213 (1996)] 等が単離され、その塩基配列が決定されている。しかしながら、アミノ酸発酵等で広く用いられている産業上重要なコリネバクテリウム属に属する微生物については、これまでにトランスアルドラーゼ遺伝子や該遺伝子にコードされる酵素に関する報告はなく、従ってその塩基配列についても全く知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明の課題は、新規に見出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する微生物、および該微生物を利用した芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質、新規な糖等の製造法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、上記課題を解決すべく組換え DNA 手法を駆使してコリネバクテリウム属に属する微生物の染色体由来の遺伝子に関して鋭意検討した。その結果、ペントースリン酸経路上でトランスアルドラーゼとは別の酵素であるトランスケトラーゼをコードする遺伝子の 3' 側下流にトランスアルドラーゼ遺伝子が隣接して存在することを初めて見出し、本願発明を完成するに至った。すなわ

ち、本願発明は下記(1)～(15)に関する。

【0007】

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1記載のポリペプチドにおいて、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド。

ただし、本願発明には公知のトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドは含まれない。

【0008】

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランスアルドラーゼ活性を有する蛋白質。

ただし、本願発明には公知のトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドは含まれない。

(4) 上記(1)～(3)いずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA。

【0009】

(6) 上記(4)または(5)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

ただし、本願発明には公知のトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドは含まれない。

【0010】

(7) 上記(4)～(6)いずれか1つに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(8) 上記(7)の組換え体DNAを保有する微生物。

【0011】

(9) 上記(4)～(6)いずれか1項に記載のDNA、または該DNAの上流に存在する転写・翻訳に関わるDNAの塩基配列中に1以上の塩基が置換

、欠失若しくは挿入されることによりトランスアルドラーゼの活性が増強された微生物。

(10) 微生物が、芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生産する能力を有する微生物である、上記(8)または(9)の微生物。

【0012】

(11) 上記(10)の微生物を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

(12) 上記(4)～(6)いずれか1項に記載のDNA、または該DNAの上流に存在する転写・翻訳に関わるDNAの塩基配列中に1以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入されることによりトランスアルドラーゼの活性が低下または欠損した微生物。

【0013】

(13) 微生物が、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生産する能力を有する微生物である、上記(8)または(12)の微生物。

(14) 上記(13)の微生物を培地に培養し、培養物中にL-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

【0014】

(15) 上記(8)または(9)の微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することを特徴とする、該糖の製造法。

【0015】

配列番号1記載のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (198



9) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、1個から数十個、特に1個から数個のアミノ酸であることが好ましい。また、本願発明のポリペプチドがトランスアルドラーゼ活性を有するためには、配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい

## 【0016】

上記(5)の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列表の配列番号2に示される塩基配列を有するDNAまたは該DNAの内部断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

## 【0017】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第2版等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号2に示される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげるこ

とができる。

#### 【0018】

本願発明により得ることのできる芳香族アミノ酸とはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどのアミノ酸をいい、芳香族ビタミンとは、葉酸(ビタミンM)、メナキノン(ビタミンK2)、p-ヒドロキシ安息香酸またはそれに由来するユビキノン、p-アミノ安息香酸(ビタミンH')、アンスラニル酸(ビタミンL)、トコフェロール(ビタミンE)などをいい、核酸関連物質とはプリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、ピリミジンヌクレオシド、プリン塩基、ピリミジン塩基、フラビンヌクレオチド等の物質をいう。

#### 【0019】

##### 【発明の実施の形態】

本願発明のトランスアルドラーゼ遺伝子は、コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体DNAから、後述する方法により単離することができる。遺伝子の供与体となるコリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する菌株であればいずれも使用できる。そのような微生物の具体例としては、例えば下記の菌株をあげることができる。

#### 【0020】

コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 31833
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 13032
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC 13868
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス	ATCC 6872
ブレビバクテリウム・イマリオフィラム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム	ATCC 14066
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
ブレビバクテリウム・ディバリカツム	ATCC 14020

ブレバクテリウム・フラブム ATCC 14067

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869

【0021】

コリネバクテリウム属に属する微生物からの染色体DNAの抽出は、培養菌体から、常法 [例えば特開昭58-126789に記載の方法] に従って容易に行うことができる。染色体DNAからのトランスアルドラーゼ遺伝子の単離は、シキミ酸要求性変異株として取得されるトランスケトラーゼ欠損変異株 [アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Appl. Microbiol. Biotechnology), 50, 375 (1998)] の相補で選択することにより実施できる。

【0022】

すなわち、染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、ベクタープラスミドに連結後、該プラスミドを用いてトランスケトラーゼ遺伝子欠損株 [例えば、コリネバクテリウム・グルタミクムTKT6株 (FERM BP-6399)] を形質転換し、シキミ酸要求性が回復した形質転換株を選択する。該形質転換株が有するプラスミドを単離することによって、トランスケトラーゼ遺伝子と共にトランスアルドラーゼ遺伝子を取得することができる。

【0023】

このようにして、配列番号2で示されるトランスアルドラーゼ遺伝子が一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5' 端および3' 端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、コリネバクテリウム属に属する微生物から調製した染色体DNAを鋳型として、PCR法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、他のコリネバクテリウム属に属する微生物から本願発明のDNAを容易に取得することができる。

【0024】

また、配列番号2で示されるDNAの全長または一部をプローブとして、コリネバクテリウム属に属する微生物から調製した染色体DNAに対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング 第2版) を行うことにより、他のコリネバクテリウム属に属する微生物から本願発明のDNAを取得することができる。

さらに、配列番号 2 で示される塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイド法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成装置で化学合成することによって、本願発明の DNA を取得することができる。

【 0 0 2 5 】

本願発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング 第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本願発明の DNA を宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【 0 0 2 6 】

該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

また、必要に応じて、本願発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換した DNA を調製する。該 DNA は本願発明のポリペプチドの効率的製造に有用である。

該 DNA 断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。

宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【 0 0 2 7 】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本願発明のポリペプチドをコードする DNA を含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本願発明の DNA、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 2 8 】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリン

ガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製) 等をあげることができる。

【0029】

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター(Ptrp×2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0030】

リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本願発明の組換えベクターにおいては、本願発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0031】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【 0 0 3 2 】

本願発明の組み換えベクターを組み込むための宿主細胞としては、エシェリヒア (Escherichia) 属、セラチア (Serratia) 属、バチルス (Bacillus) 属、ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli GI698、Escherichia coli TB1、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas putida、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【 0 0 3 3 】

例えば、コリネバクテリウム属に属する微生物を用いる場合の組換えベクターとしては、pCG1(特開昭57-134500)、pCG2(特開昭58-35197)、pCG4、pCG11(いずれも特開昭57-183799)、pCE54、pCB101(いずれも特開昭58-105999)、pCE51、pCE52、pCE53[いずれもモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Mol. Genet.), 196, 175 (1984)]、pCSEK20、pCLEK4[いずれもアブライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー(Appl. Microbiol. Biotechnol.), 51, 201 (1999)] などのプラスミドを使用することができる。

【 0 0 3 4 】

また、コリネバクテリウム属に属する微生物を用いる場合の組換えベクターの導入方としては、プロトプラスト法（特開昭57-183799）、電気パルス法（特開平2-207791）が特に有効である。宿主菌としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) , 53, 159(1970)] などを用いることができる。

【 0 0 3 5 】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、組換えベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【 0 0 3 6 】

宿主細胞としては、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Schizosaccharomyces) 属、クリベロマイセス (Kluyveromyces) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、シワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ピヒア (Pichia) 属、キャンディダ (Candida) 属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Candida utilis等をあげることができる。

【 0 0 3 7 】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol. gy, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができ

る。

【0038】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0039】

本願発明におけるトランスアルドラーゼ遺伝子には、トランスアルドラーゼの機能が增加、低下、若しくは欠損しているものも含まれる。従って、前述の如く、塩基配列の一部の配列が他の塩基と置換されていても、欠失されていてもよく、新たに塩基が挿入されていてもよい。

本願発明で新規に見出されたトランスアルドラーゼ遺伝子やその塩基配列情報を用いることにより、芳香族アミノ酸や芳香族ビタミン等の芳香族化合物、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、あるいはリボフラビン等の生産能を有する微生物のトランスアルドラーゼ活性を所望に改変することが可能となり、それによりそれら代謝産物の工業的に有利な製造法を提供することができる。

【0040】

たとえば、本願発明のトランスアルドラーゼ遺伝子を含有する組み換え体プラスミドを、芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンの生産菌に導入して、トランスアルドラーゼの活性を高めることにより、それら芳香族化合物の生産効率を向上させることができる。

また、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、あるいはリボフラビン等の生産菌のトランスアルドラーゼ遺伝子に、該活性を低下または欠損させる変異を導入することにより、それらの生産効率を向上させることができる。

【0041】

このようにして得られた微生物を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸、



芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質などを生成蓄積させ、該培養物中から該物質を採取することにより、該物質を効率よく生産することができる。

該微生物の培養は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

#### 【0042】

培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

#### 【0043】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

#### 【0044】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

#### 【0045】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を

培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0046】

上記のとおり、本願発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物を通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0047】

本願発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0048】

本願発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平5-336963、特開平6-823021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0049】

本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離精製法を用いることができる。例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

## 【0050】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

## 【0051】

本発明のポリペプチド、あるいは該ポリペプチドに糖鎖の付加されたポリペプチド等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

## 【0052】

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

このようにして取得されるポリペプチドとして、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。

#### 【0053】

上記方法により得られた微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にトランスアルドラーゼ活性により該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することもできる。

該ケトースとしては例えば、セドヘプツロース 7-リン酸、フルクトース 6-リン酸等があげられ、該アルドースとしては例えば、エリスロース 4-リン酸、グリセルアルデヒド 3-リン酸などがあげられる。

#### 【0054】

微生物の培養物の処理物としては、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物等、該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

本願発明により得られる糖の生成において用いられる酵素源は、37℃で1分間に1ミリモルの本願発明により得られる糖を生成することのできる活性を1単位（U）として、1mU／1～1,000U／1であり、好ましくは10mU／1～100U／1の濃度で用いる。

本願発明により得られる糖の生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メ

タノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

#### 【0055】

本願発明により得られる糖の生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ガラクトース含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50g/lの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50ml/lの濃度で用いられる。

#### 【0056】

水性媒体中に生成した本願発明により得られる糖の定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)〕。

反応液中に生成した本願発明により得られる糖の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

#### 【0057】

該方法を用いることにより、従来は合成することが困難であった糖の合成が容易に出来るようになり、また、新規な糖を合成することも可能となる。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【0058】

##### 【実施例】

(1) コリネバクテリウム グルタミクムのトランスケトラゼ欠損変異株の取得

コリネバクテリウム グルタミクム L22 [野生型株 ATCC31833 から誘導されたリゾチーム感受性変異株; R. Katsumata et al., Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., 4, 767 (1987)] を NB 培地 [粉末ブイヨン 20 g、酵母エキス 5 g を水 1 L に含み、pH 7.2 に調整した培地] 3 ml 中に植菌し、30℃ で OD<sub>660</sub> が約 0.6 になるまで培養した。

【0059】

培養後、遠心分離により集菌し、得られた菌体を 50 mM トリスマレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で一回洗浄し、NTG 400 mg/L を含む同緩衝液 3 ml 中、室温で 20 分間変異処理を行った。

該処理菌体を同緩衝液で 2 回遠心洗浄後、NB 培地 3 ml 中、30℃ で 1 時間培養した。

【0060】

該培養液を生理食塩水で  $10^{-5}$  ~  $10^{-6}$  に希釈し、得られた希釈液 0.1 ml を NB 寒天培地 [NB 培地に寒天を 1.4% 含む培地、pH 7.2] に塗布し、30℃ で 2 日間培養した。

寒天培地上に生育してきたコロニーを、最少寒天培地 M1 [グルコース 10 g、(NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、KCl 0.2 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 0.2 mg、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.9 mg、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.4 mg、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 0.09 mg、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.04 mg、ビオチン 50 mg、p-アミノ安息香酸 2.5 mg、チアミン塩酸塩 1 mg および寒天 16 g を水 1 L に含み、pH 7.2 に調整した培地] およびシキミ酸 50 mg/L を含む M1 寒天培地に各々塗布し、30℃ で培養した。

【0061】

最少寒天培地 M1 では生育せず、シキミ酸 50 mg/L を含む M1 寒天培地で生育できる株を、シキミ酸要求変異株として分離した。分離されたシキミ酸要求変異株を、シキミ酸 50 mg/L を含む M1 寒天培地および該培地中のグルコ

ースをリボースに置き換えた培地に各々塗布し、30℃で培養した。

該シキミ酸要求変異株の中で、シキミ酸50mg/Lを含むM1寒天培地で生育するが、該培地中のグルコースをリボースに置き換えた培地では生育できない株を、シキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株として分離した。

【0062】

分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株を、シキミ酸50mg/Lを含むM1培地40ml中30℃で24時間培養後、遠心分離して得た菌体を超音波破碎し、遠心分離することで無細胞抽出液を調製した。該無細胞抽出液を粗酵素液として、トランスケトラーゼの活性を以下のようにして測定した。

【0063】

トリス 50mM (pH 7.5)、NADH 0.2mM、チアミンピロリン酸 0.01mM、MgCl<sub>2</sub> 1mM、キシロース-5-リン酸 0.5mM、リブロース-5-リン酸 0.5mM、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートイソメラーゼ混合液（ベーリンガー・マンハイム社製）10μgを含む反応液に粗酵素液を加えて1.5mlとし、30℃で反応を行った。

【0064】

分光光度計を用いて340nmにおけるNADHの吸光度の減少を測定することにより、生成されるグリセルアルデヒド-3-リン酸量を測定した。

該測定により、分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株より、グリセルアルデヒド-3-リン酸を全く生成しない、トランスケトラーゼ活性を欠損した変異株TKT6株を選択した。

コリネバクテリウム グルタミカム TKT6株は、ブダペスト条約に基づいて、平成10年6月30日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）にFERM BP-6399号として寄託されている。

【0065】

(2) トランスケトラーゼ遺伝子およびトランスアルドラーゼ遺伝子を含む

## DNA断片のクローニング

両遺伝子の供給源としてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833の染色体DNAを、該遺伝子の受容菌として実施例1にて取得したコリネバクテリウム・グルタミクムのトランスケトラゼ遺伝子欠損株TKT6(FERM BP-6399)を用いた。ベクターは、コリネバクテリウム・グルタミクムで複製可能なプラスミドpCSEK20を用いた。pCSEK20は、コリネバクテリウム・グルタミクム由来のプラスミドpCG2(特開昭58-35197)の複製開始点、同じくコリネバクテリウム・グルタミクム由来のプラスミドpCG4(特開昭57-183799)のスペクチノマイシンおよびストレプトマイシン耐性遺伝子、およびエシェリヒア・コリの一般的ベクターであるpGA22[ジャーナル・オブ・バクテリオロジー[J. Bacteriol., 140, 400(1979)]のカナマイシン耐性遺伝子から成るプラスミドである[アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 201 (1999))]

## 【0066】

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833の培養および培養菌体からの染色体DNAの調製は、特開平6-169785記載の方法に従って行った。pCSEK20は、これを保有させたコリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833の培養菌体から特開平6-169785記載のベクターの調製方法に従って単離した。

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833の染色体DNAからのトランスケトラゼ遺伝子およびトランスアルドラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニングは、以下のようにして行った。

## 【0067】

上記のように調製した染色体DNAおよびpCSEK20プラスミドDNA各々1  $\mu$ gをEcoRI(5単位)で切断し、両切断物を宝酒造社製ライゲーションキットを用いて連結処理した。このようにして構築されたプラスミドを用いて、シキミ酸要求性を示すコリネバクテリウム・グルタミクムのトランスケトラゼ遺伝子欠損株TKT6(FERM BP-6399)を以下の方法で形質転換した。

## 【0068】

コリネバクテリウム・グルタミクムTKT6を、NB培地5ml中に植菌し、30℃で



1日培養した種培養液4mlをシキミ酸 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むSSM培地〔グルコース20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g、尿素3g、酵母エキス1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4mg、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.09mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04mg、ビオチン $30\mu\text{g}$ およびサイアミン塩酸塩1mgを水1lに含み、pH7.2に調整した培地〕40mlに植菌し、 $30^\circ\text{C}$ で $\text{OD}_{660}$ が0.6になるまで振とう培養した。

【0069】

菌体を集菌し、該細胞をRCGP培地〔グルコース5g、カザミノ酸5g、酵母エキス2.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.5g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.41g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04mg、ビオチン $30\mu\text{g}$ およびサイアミン塩酸塩2mg、コハク酸二ナトリウム135g、ポリビニルピロリドン（分子量10,000）30gを水1lに含む培地〕に $1\text{mg}/\text{ml}$ のリゾチームを含む溶液（pH7.6）10mlに約 $10^9$ 細胞/ $\text{ml}$ となるように懸濁し、L型試験管に移して $30^\circ\text{C}$ で6時間穏やかに振とうし反応させてプロトプラスト化した。

【0070】

このプロトプラスト菌液0.5mlを小試験管にとり、 $2,500 \times g$ で5分間遠心分離し、TSMC緩衝液（ $\text{MgCl}_2$ 10mM、 $\text{CaCl}_2$ 30mM、トリス50mM、ショ糖400mM、pH7.5）1mlに再懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlに再懸濁した。この菌液に2倍濃度のTSMC緩衝液と上記連結混合液の1対1混合液 $100\mu\text{l}$ を加えて混和し、ついでTSMC緩衝液中に20%PEG6,000を含む液0.8mlを添加して混合した。3分後、RCGP培地（pH7.2）2mlを添加し、 $2,500 \times g$ で5分間遠心分離にかけて上澄み液を除去し、沈殿したプロトプラストを1mlのRCGP培地に懸濁してから、この菌液0.2mlをカナマイシン $200\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むRCGP寒天培地（RCGP培地に1.4%寒天を含む培地、pH7.2）に

塗布し、30℃で10日間培養した。

#### 【0071】

寒天培地上に生育したコロニーをかき集め、生理食塩水で2回遠心洗浄後、生理食塩水1mlに懸濁した。この菌液をカナマイシン20μg/mlを含有する最少寒天培地M1 [グルコース10g、(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、KCl 0.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 0.2mg、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9mg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.4mg、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.09mg、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.04mg、ビオチン50μg、P-アミノ安息香酸2.5mg、サイアミン塩酸塩1mgおよび寒天16gを水1lに含み、pH7.2に調整した培地]上に再塗布して30℃で3日間培養し、カナマイシン耐性で、シキミ酸非要求性となった形質転換株を選択した。

#### 【0072】

これらの形質転換株から特開平6-169785記載のベクターの調製方法に従ってプラスミドDNAを単離した。形質転換株の一株から得られ、pCTK60と命名したプラスミドは、各制限酵素による切断産物をアガロースゲル電気泳動法で解析した結果、pCSEK20のEcoRI部位に約7.6kbのEcoRIDNA断片が挿入された構造を有していることがわかった。サブクローニングと相補試験の結果、同DNA断片内の約4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片上に、少なくともトランスケトラゼ遺伝子が存在することがわかった。

#### 【0073】

##### (3) XhoI-EcoRIDNA断片の塩基配列決定

上記約4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片を含有するプラスミドから常法に従って該DNA断片を回収した。該DNA断片およびベクターpUC19 (宝酒造社製)を種々の制限酵素を用いて分解後、T4DNAリガーゼを用いてベクターDNA断片と分解DNA断片とを結合させた。得られた連結混合液を用いて、常法に従い大腸菌DH5α (東洋紡社製)を形質転換した。得られた形質転換菌をアンピシリンを最終濃度で100μg/ml含有するLB寒天培地 [トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g、寒天 20gを水1lに溶解した培地]

に塗布し、37℃で16時間培養した。

【0074】

選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で100  $\mu$ g/ml 含有するLB培養液に植菌し、30℃で12時間培養した。培養菌体からアルカリ-SDS法（モレキュラー・クローニング 第2版）によりプラスミドを抽出した。

抽出したプラスミドDNAを用いて、ジデオキシヌクレオシド酵素法によりベクターpUC19に挿入された各種DNA断片の塩基配列を決定した。具体的には、アマシャム社製サーモ・シーケナーゼ・サイクル・シーケンス・キット（Thermo Sequenase cycle sequencing kit; Amersham）を用いてプロトコルに従い反応させた後、ライ・コア社製DNAシーケンサー LONG READER 4200を用いて挿入DNA断片の塩基配列を決定した。該挿入DNA断片の塩基配列を配列番号3に示した。

【0075】

これら配列の解析は、ソフトウェア・デベロップメント社製のシーケンス解析ソフト ジェネチック・マック（GENETYX MAC）ATSQ 3.0を用いて行った。その結果、4.1 kbのXhoI-EcoRI DNA断片の塩基配列中には、2つのオープンリーディングフレームが存在することが分かった。

それらの塩基配列から推定されるアミノ酸の一次構造を、分類学的にコリネバクテリウム属と近縁のマイコバクテリウム・ツベルクロシスのトランスケトラゼおよびトランスアルドラーゼのアミノ酸一次構造と比較した結果、配列表の配列番号3記載の塩基配列中373番目から2472番目までのオープンリーディングフレームがトランスケトラゼ遺伝子であり、2643番目から3722番目までのオープンリーディングフレームがトランスアルドラーゼ遺伝子であることが判明した。該トランスアルドラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームから推測されるアミノ酸配列を配列番号1に、塩基配列を配列番号2に示した。

【0076】

（4）トランスケトラゼおよびトランスアルドラーゼの活性測定

上記約4.1 kbのXhoI-EcoRI DNA断片の両末端を常法に従って平滑末端に

修復後、コリネバクテリウム・グルタミクムで複製可能なベクターpCG116 [アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Appl. Microbiol. Biotechnol.), 51, 201 (1999)] の SmaI 部位に挿入して、組換え体プラスミド pHTK65 を構築した。コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC31833 を該組換え体プラスミドで形質転換し、該形質転換株のトランスケトラーゼおよびトランスアルドラーゼの活性を測定した。トランスケトラーゼ活性は特開平6-169785記載の方法に従って測定した。トランスアルドラーゼ活性は、以下のようにして測定した。

## 【0077】

トリス 40 mM (pH 7.6)、ジホスホピリジン 0.1 mM、フルクトース 6-リン酸 2.8 mM、エリスロース 4-リン酸 0.2 mM、グリセロール 3-リン酸-デヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートイソメラーゼ混合液 (ベーリンガー マンハイム社製) 10  $\mu$ g を含む反応液に粗酵素液を加えて 1 ml とし、25℃で反応を開始した。生成したグリセルアルデヒド 3-リン酸を、分光光度計を用いて 340 nm における吸光度の減少を測定することにより定量した。その結果、ATCC31833 株のトランスケトラーゼおよびトランスアルドラーゼの単位蛋白質重量および単位時間あたりの活性をそれぞれ 1 とした時の pHTK65 を保有する形質転換株の活性は、いずれも 5 倍以上に増加していた。

## 【0078】

## 【発明の効果】

本願発明で新規に見い出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、その塩基配列情報、該遺伝子にコードされるポリペプチド、またはそのアミノ酸配列情報を用いることにより、アミノ酸発酵等で広く用いられている産業上重要なコリネバクテリウム属に属する微生物のトランスアルドラーゼを所望に改変した発酵生産菌を育種することができる。さらに、糖類やその誘導体の合成など、立体選択的な炭素-炭素結合形成反応に有用なトランスアルドラーゼ高活性微生物を育種することができる。

## 【0079】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel Transaldolase

<130> H11-0802T4

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC31388

<400> 1

```
atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc act tgg ctc   48
Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
      1             5             10             15
```

```
gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc agc cag gtt   96
Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val
      20             25             30
```

att gag gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca gct att ttc	144
Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pr Ala Ile Phe	
35 40 45	
gca gca gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag atc gca gag	192
Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu	
50 55 60	
ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc	240
Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser	
65 70 75 80	
atc gac gat gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag	288
Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu	
85 90 95	
tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt	336
Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg	
100 105 110	
atc tct gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag gag ctg tgg	384
Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp	
115 120 125	
gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca	432
Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro	
130 135 140	
ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt	480

Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val

145 150 155 160

aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct 528

Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala

165 170 175

gcg tac atc gag gga atc aag cag gca gct gca aac ggc cac gac gta 576

Ala Tyr Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val

180 185 190

tcc aag atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc gtc gac gtt 624

Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val

195 200 205

gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct 672

Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala

210 215 220

ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg 720

Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val

225 230 235 240

tac aag gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt gcc aac act 768

Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr

245 250 255

cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct gcg tac gct 816

Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala

260	265	270	
gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc 864			
Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr			
275	280	285	
atg cca gaa ggc acc atc gac gct gtt ctg gaa ctg ggc aac ctg cac 912			
Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Leu Gly Asn Leu His			
290	295	300	
ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtg ttc tcc 960			
Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser			
305	310	315	320
cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg 1008			
Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu			
325	330	335	
gag acc gag ggt gtg gac aag ttt gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt 1056			
Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu			
340	345	350	
gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag			
Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys			
355	360		

<210> 2

<211> 1080

<212> DNA



<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC31388

<400> 2

atgtctcaca ttgatgatct tgcacagctc ggcacttcca cttaggctcga cgacctctcc 60  
cgcgagcgca ttacttccgg caatctcagc caggttattg aggaaaagtc tgtagtcggt 120  
gtcaccacca acccagctat tttcgcagca gcaatgtcca agggcgattc ctacgacgct 180  
cagatcgagc agctcaaggc cgctggcgca tctgttgacc aggctgttta cgccatgagc 240  
atcgacgatg ttcgcaatgc ttgtgatctg ttcaccggca tcttcgagtc ctccaacggc 300  
tacgacggcc gcgtgtccat cgaggttgac ccacgtatct ctgctgaccg cgacgcaacc 360  
ctggctcagg ccaaggagct gtgggcaaag gttgatcgtc caaacgtcat gatcaagatc 420  
cctgcaaccc caggttcttt gccagcaatc accgacgctt tggctgaggg catcagcgtt 480  
aacgtcacct tgatcttctc cgttgctcgc taccgcgagg tcatcgctgc gtacatcgag 540  
ggaatcaagc aggcagctgc aaacggccac gacgtatcca agatccactc tgttggttcc 600  
ttcttcgtct cccgcgtcga cgttgagatc gacaagcgcc tcgaggcaat cggatccgat 660  
gaggctttgg ctctgcgcgg caaggcaggc gttgccaacg ctcagcgcgc ttacgctgtg 720  
tacaaggagc ttttcgacgc cgccgagctg cctgaaggtg ccaacactca gcgcccactg 780

tgggcatcca ccggcgtgaa gaaccctgcg tacgctgcaa ctctttacgt ttccgagctg 840

gctgggtccaa acaccgtcaa caccatgccaa gaaggcacca tcgacgctgt tctggaactg 900

ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag aagctgacgc tgtgttctcc 960

cagcttgagg ctctgggcgt tgacttggca gatgtcttcc aggtcctgga gaccgagggt 1020

gtggacaagt ttgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt ccatggaagc tcgcctgaag 1080

<210> 3

<211> 4108

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC31388

<221> CDS

<222> (373)..(2472)

<221> CDS

<222> (2643)..(3722)

<400> 3

tcgagagttt gaaggggtcc gattcgttcc gttcgtgacg ctttgtgagg ttttttgacg 60

ttgcaccgta ttgcttgccg aacatttttc ttttcctttc ggtttttcga gaattttcac 120

ctacaaaagc ccacgtcaca gctcccagac ttaagattgg tcacaccttt gacacatttg 180

aaccacagtt ggttataaaa tgggttcaac atcactatgg ttagaggtgt tgacgggtca 240

gattaagcaa agactacttt cggggtagat cacctttgcc aaatttgaat caattaacct 300

aagtcgtaga tctgatcatc ggatctaacg aaaacgaacc aaaactttgg tcccggttta 360

accaggaag ga atg acc acc ttg acg ctg tca cct gaa ctt cag gcg ctc 411

Met Thr Thr Leu Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gln Ala Leu

1

5

10

act gta cgc aat tac ccc tct gat tgg tcc gat gtg gac acc aag gct 459

Thr Val Arg Asn Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Asp Val Asp Thr Lys Ala

15

20

25

gta gac act gtt cgt gtc ctc gct gca gac gct gta gaa aac tgt ggc 507

Val Asp Thr Val Arg Val Leu Ala Ala Asp Ala Val Glu Asn Cys Gly

30

35

40

45

tcc ggc cac cca ggc acc gca atg agc ctg gct ccc ctt gca tac acc 555

Ser Gly His Pro Gly Thr Ala Met Ser Leu Ala Pro Leu Ala Tyr Thr

50

55

60

ttg tac cag cgg gtt atg aac gta gat cca cag gac acc aac tgg gca 603

Leu Tyr Gln Arg Val Met Asn Val Asp Pro Gln Asp Thr Asn Trp Ala

65

70

75

ggc cgt gac cgc ttc gtt ctt tct tgt ggc cac tcc tct ttg acc cag 651

Gly Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Cys Gly His Ser Ser Leu Thr Gln

特平 1 1 — 2 6 6 5 4 8

80	85	90	
tac atc cag ctt tac ttg ggt gga ttc ggc ctt gag atg gat gac ctg 699			
Tyr Ile Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Phe Gly Leu Glu Met Asp Asp Leu			
95	100	105	
aag gct ctg cgc acc tgg gat tcc ttg acc cca gga cac cct gag tac 747			
Lys Ala Leu Arg Thr Trp Asp Ser Leu Thr Pro Gly His Pro Glu Tyr			
110	115	120	125
cgc cac acc aag ggc gtt gag atc acc act ggc cct ctt ggc cag ggt 795			
Arg His Thr Lys Gly Val Glu Ile Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly			
130	135	140	
ctt gca tct gca gtt ggt atg gcc atg gct gct cgt cgt gag cgt ggc 843			
Leu Ala Ser Ala Val Gly Met Ala Met Ala Ala Arg Arg Glu Arg Gly			
145	150	155	
cta ttc gac cca acc gct gct gag ggc gaa tcc cca ttc gac cac cac 891			
Leu Phe Asp Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ser Pro Phe Asp His His			
160	165	170	
atc tac gtc att gct tct gat ggt gac ctg cag gaa ggt gtc acc tct 939			
Ile Tyr Val Ile Ala Ser Asp Gly Asp Leu Gln Glu Gly Val Thr Ser			
175	180	185	
gag gca tcc tcc atc gct ggc acc cag cag ctg ggc aac ctc atc gtg 987			
Glu Ala Ser Ser Ile Ala Gly Thr Gln Gln Leu Gly Asn Leu Ile Val			
190	195	200	205

ttc tgg gat gac aac cgc atc tcc atc gaa gac aac act gag atc gct 1035  
Phe Trp Asp Asp Asn Arg Ile Ser Ile Glu Asp Asn Thr Glu Ile Ala

210

215

220

ttc aac gag gac gtt gtt gct cgt tac aag gct tac ggc tgg cag acc 1083  
Phe Asn Glu Asp Val Val Ala Arg Tyr Lys Ala Tyr Gly Trp Gln Thr

225

230

235

att gag gtt gag gct ggc gag gac gtt gca gca atc gaa gct gca gtg 1131  
Ile Glu Val Glu Ala Gly Glu Asp Val Ala Ala Ile Glu Ala Ala Val

240

245

250

gct gag gct aag aag gac acc aag cga cct acc ttc atc cgc gtt cgc 1179  
Ala Glu Ala Lys Lys Asp Thr Lys Arg Pro Thr Phe Ile Arg Val Arg

255

260

265

acc atc atc ggc ttc cca gct cca acc atg atg aac acc ggt gct gtg 1227  
Thr Ile Ile Gly Phe Pro Ala Pro Thr Met Met Asn Thr Gly Ala Val

270

275

280

285

cac ggt gct gct ctt ggc gca gct gag gtt gca gca acc aag act gag 1275  
His Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala Thr Lys Thr Glu

290

295

300

ctt gga ttc gat cct gag gct cac ttc gcg atc gac gat gag gtt atc 1323  
Leu Gly Phe Asp Pro Glu Ala His Phe Ala Ile Asp Asp Glu Val Ile

305

310

315

gct cac acc cgc tcc ctc gca gag cgc gct gca cag aag aag gct gca 1371

Ala His Thr Arg Ser Leu Ala Glu Arg Ala Ala Gln Lys Lys Ala Ala

320

325

330

tgg cag gtc aag ttc gat gag tgg gca gct gcc aac cct gag aac aag 1419

Trp Gln Val Lys Phe Asp Glu Trp Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Lys

335

340

345

gct ctg ttc gat cgc ctg aac tcc cgt gag ctt cca gcg ggc tac gct 1467

Ala Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser Arg Glu Leu Pro Ala Gly Tyr Ala

350

355

360

365

gac gag ctc cca aca tgg gat gca gat gag aag ggc gtc gca act cgt 1515

Asp Glu Leu Pro Thr Trp Asp Ala Asp Glu Lys Gly Val Ala Thr Arg

370

375

380

aag gct tcc gag gct gca ctt cag gca ctg ggc aag acc ctt cct gag 1563

Lys Ala Ser Glu Ala Ala Leu Gln Ala Leu Gly Lys Thr Leu Pro Glu

385

390

395

ctg tgg ggc ggt tcc gct gac ctc gca ggt tcc aac aac acc gtg atc 1611

Leu Trp Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Gly Ser Asn Asn Thr Val Ile

400

405

410

aag ggc tcc cct tcc ttc ggc cct gag tcc atc tcc acc gag acc tgg 1659

Lys Gly Ser Pro Ser Phe Gly Pro Glu Ser Ile Ser Thr Glu Thr Trp

415

420

425

tct gct gag cct tac ggc cgt aac ctg cac ttc ggt atc cgt gag cac 1707

Ser Ala Glu Pro Tyr Gly Arg Asn Leu His Phe Gly Ile Arg Glu His  
430 435 440 445

gct atg gga tcc atc ctc aac ggc att tcc ctc cac ggt ggc acc cgc 1755  
Ala Met Gly Ser Ile Leu Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Thr Arg  
450 455 460

cca tac ggt gga acc ttc ctc atc ttc tcc gac tac atg cgt cct gca 1803  
Pro Tyr Gly Gly Thr Phe Leu Ile Phe Ser Asp Tyr Met Arg Pro Ala  
465 470 475

gtt cgt ctt gca gct ctc atg gag acc gac gct tac tac gtc tgg acc 1851  
Val Arg Leu Ala Ala Leu Met Glu Thr Asp Ala Tyr Tyr Val Trp Thr  
480 485 490

cac gac tcc atc ggt ctg ggc gaa gat ggc cca acc cac cag cct gtt 1899  
His Asp Ser Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Val  
495 500 505

gaa acc ttg gct gcg ctg cgc gcc atc cca ggt ctg tcc gtc ctg cgt 1947  
Glu Thr Leu Ala Ala Leu Arg Ala Ile Pro Gly Leu Ser Val Leu Arg  
510 515 520 525

cct gca gat gcg aat gag acc gcc cag gct tgg gct gca gca ctt gag 1995  
Pro Ala Asp Ala Asn Glu Thr Ala Gln Ala Trp Ala Ala Ala Leu Glu  
530 535 540

tac aag gaa ggc cct aag ggt ctt gca ctg acc cgc cag aac gtt cct 2043  
Tyr Lys Glu Gly Pro Lys Gly Leu Ala Leu Thr Arg Gln Asn Val Pro

545	550	555	
ggt ctg gaa ggc acc aag gag aag gct gct gaa ggc gtt cgc cgc ggt			2091
Val Leu Glu Gly Thr Lys Glu Lys Ala Ala Glu Gly Val Arg Arg Gly			
560	565	570	
ggc tac gtc ctg gtt gag ggt tcc aag gaa acc cca gat gtg atc ctc			2139
Gly Tyr Val Leu Val Glu Gly Ser Lys Glu Thr Pro Asp Val Ile Leu			
575	580	585	
atg ggc tcc ggc tcc gag gtt cag ctt gca gtt aac gct gcg aaa gct			2187
Met Gly Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Ala			
590	595	600	605
ctg gaa gct gag ggc gtt gca gct cgc gtt gtt tca gtt cct tgc atg			2235
Leu Glu Ala Glu Gly Val Ala Ala Arg Val Val Ser Val Pro Cys Met			
610	615	620	
gat tgg ttc cag gag cag gac gca gag tac atc gag tcc gtt ctg cct			2283
Asp Trp Phe Gln Glu Gln Asp Ala Glu Tyr Ile Glu Ser Val Leu Pro			
625	630	635	
gca gct gtg acc gct cgt gtg tct gtt gaa gct ggc atc gca atg cct			2331
Ala Ala Val Thr Ala Arg Val Ser Val Glu Ala Gly Ile Ala Met Pro			
640	645	650	
tgg tac cgc ttc ttg ggc acc cag ggc cgt gct gtc tcc ctt gag cac			2379
Trp Tyr Arg Phe Leu Gly Thr Gln Gly Arg Ala Val Ser Leu Glu His			
655	660	665	



ttc ggt gct tct gcg gat tac cag acc ctg ttt gag aag ttc ggc atc 2427

Phe Gly Ala Ser Ala Asp Tyr Gln Thr Leu Phe Glu Lys Phe Gly Ile

670

675

680

685

acc acc gat gca gtc gtg gca gcg gcc aag gac tcc att aac agt 2472

Thr Thr Asp Ala Val Val Ala Ala Ala Lys Asp Ser Ile Asn Ser

690

695

700

taattgccct gctgttttta gcttcaaccc ggggcagtat gattctccgg aattttattg 2532

ccccgggttg ttgttgtaa tcggtacaaa gggctttaag cacatccctt acttgccctgc 2592

tciccttgag cacagttcaa gaacaattct ttttaaggaaa atttagtttc atg tct 2648

Met Ser

1

cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc act tgg ctc gac gac 2696

His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu Asp Asp

5

10

15

ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc agc cag gtt att gag 2744

Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val Ile Glu

20

25

30

gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca gct att ttc gca gca 2792

Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe Ala Ala

35

40

45

50

gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag atc gca gag ctc aag 2840

Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu Leu Lys

55

60

65

gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc atc gac 2888

Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser Ile Asp

70

75

80

gat gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag tcc tcc 2936

Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu Ser Ser

85

90

95

aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt atc tct 2984

Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg Ile Ser

100

105

110

gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag gag ctg tgg gca aag 3032

Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp Ala Lys

115

120

125

130

gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca ggt tct 3080

Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro Gly Ser

135

140

145

ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt aac gtc 3128

Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val Asn Val

150

155

160

acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct gcg tac 3176

Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala Ala Tyr

165	170	175	
atc gag gga atc aag cag gca gct gca aac ggc cac gac gta tcc aag			3224
Ile. Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val Ser Lys			
180	185	190	
atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc gtc gac gtt gag atc			3272
Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val Glu Ile			
195	200	205	210
gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct ctg cgc			3320
Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg			
215	220	225	
ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg tac aag			3368
Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val Tyr Lys			
230	235	240	
gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt gcc aac act cag cgc			3416
Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr Gln Arg			
245	250	255	
cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct gcg tac gct gca act			3464
Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala Ala Thr			
260	265	270	
ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc atg cca			3512
Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr Met Pro			
275	280	285	290

gaa ggc acc atc gac gct gtt ctg gaa ctg ggc aac ctg cac ggt gac 3560

Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Leu Gly Asn Leu His Gly Asp

295

300

305

acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtg ttc tcc cag ctt 3608

Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser Gln Leu

310

315

320

gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg gag acc 3656

Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu Glu Thr

325

330

335

gag ggt gtg gac aag ttt gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt gag tcc 3704

Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu Glu Ser

340

345

350

atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcac agtaacggcg 3752

Met Glu Ala Arg Leu Lys

355

360

acatgaaatc gaattagttc gatcttatgt ggccgttaca catctttcat taaagaaagg 3812

atcgtgacgc taccatcgtg agcacaaca cgacccctc cagctggaca aaccactgc 3872

gcgacccgca ggataaacga ctccccgca tcgctggccc ttccggcatg gtgatcttcg 3932

gtgtcactgg cgacttggct cgaaggaagc tgctccccgc catttatgat ctagcaaacc 3992

gcggattgct gccccagga ttctcgttgg taggttacgg ccgccgcgaa tggtccaaag 4052

aagacttga aaaatacgta cgcgatgccg caagtgctgg tgctcgtacg gaattc 4108

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する微生物、および該微生物を利用した芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸、核酸関連物質、新規な糖等の製造法を提供する。

【解決手段】 コリネバクテリウム属に属し、シキミ酸要求性変異株として取得されるトランスケトラーゼ欠損変異株のシキミ酸要求性を相補するDNA断片として、コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体DNAより新規トランスアルドラーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を含む組換え体DNAを構築し、該組換え体DNAを宿主微生物に導入する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**